

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003496229

WPI Acc No: 1982-44192E/198222

Related WPI Acc No: 1982-44193E; 1983-07693K

**High mol. wt. co-polyester(s) prepd. by fermentation - contain  
hydroxybutyric acid units and units of other hydroxy acids**

Patent Assignee: IMPERIAL CHEM IND PLC (ICIL )

Inventor: COLLINS S H; HOLMES P A; WRIGHT L F

Number of Countries: 012 Number of Patents: 015

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 52459	A	19820526	EP 81305186	A	19811030	198222	B
JP 57111349	A	19820710				198233	
JP 57150393	A	19820917				198243	
US 4393167	A	19830712				198330	
DE 3168826	G	19850321				198513	
EP 52459	B	19851204				198549	
DE 3173154	G	19860116				198604	
SU 1375143	A	19880215	SU 3359451	A	19811117	198835	
JP 3149255	A	19910625				199131	
JP 92069186	B	19921105	JP 81185152	A	19811118	199249	
JP 92070342	B	19921110	JP 81185152	A	19811118	199249	
			JP 90278838	A	19811118		
JP 5015383	A	19930126	JP 81185153	A	19811118	199309	
			JP 91332243	A	19811118		
JP 94015604	B2	19940302	JP 81185153	A	19811118	199412	
JP 95047623	B2	19950524	JP 82118316	A	19820707	199525	
			JP 93218771	A	19820707		
JP 2577841	B2	19970205	JP 81185153	A	19811118	199710	
			JP 91332243	A	19811118		

Priority Applications (No Type Date): GB 8213697 A 19820512; GB 8036967 A  
19801118; GB 8120991 A 19810707

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; GB 1207599; US 3275610; GB 1207588

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 52459	A	E	37		
Designated States (Regional): CH DE FR GB IT LI NL SE					
EP 52459	B	E			
Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE					
JP 92069186	B		15	C08L-067/04	Based on patent JP 57111349
JP 92070342	B		9	C08L-067/04	Div ex application JP 81185152
					Based on patent JP 3149255
JP 5015383	A		18	C12P-007/42	Div ex application JP 81185153
JP 94015604	B2		14	C08G-063/06	Based on patent JP 57150393
JP 95047623	B2		22	C08G-063/06	Div ex application JP 82118316
					Based on patent JP 6172501
JP 2577841	B2		19	C08J-005/00	Div ex application JP 81185153
					Previous Publ. patent JP 5015383

Abstract (Basic): EP 52459 A

Novel thermoplastic polyester copolymers of wt. ave. mol. wt. above 10000 (pref. above 200000) contain 99.9-50 mol.% beta-hydroxybutyric acid repeat units of formula -O-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CO- (I) and 0.1-50 (pref. 1-40) mol.% of units of formula O-CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>n</sub>CO- (II). In the formulae, n=0 or 1, and R<sub>1</sub>-4 are each opt. OH or halo-substd. hydrocarbon, OH, halogen, or H provided that when n=1 and R<sub>2</sub>-4 are each H, R<sub>1</sub> is not Me.

Prod'n. of the copolyesters is by cultivating a polyester-

accumulating micro-organism in an aq. medium on a water-soluble assimilable C-contg. substrate, at least part of the cultivation being under conditions of limitation for one or more of the essential requirements for microbial growth, excluding polyester accumulation. The characteristic feature of the process is that during at least a part of the time when such limitation holds the substrate comprises an organic acid (or salt) which is metabolisable to a polyester other than one composed only of (I) units.

By incorporation of (II) units the crystallinity and m.pt. of the prod. are reduced thus making it more suitable for melt processing e.g. to film. The copolyesters can also be used in amts. of 0.5-10 wt.% as processing aids of vinyl chloride polymers; random copolymers are esp. suitable for this use.

Dwg.1/3

Abstract (Equivalent): EP 52459 B

Novel thermoplastic polyester copolymers of wt. ave. mol. wt. above 10000 (pref. above 200000) contain 99.9-50 mol.% beta-hydroxybutyric acid repeat units of formula  $-O-CH(CH_3)-CH_2-CO-$  (I) and 0.1-50 (pref. 1-40) mol.% of units of formula  $O-CR_1R_2-(CR_3R_4)_nCO-$  (II). In the formulae,  $n=0$  or 1, and  $R_1-4$  are

each opt. OH or halo-substd. hydrocarbon, OH, halogen, or H provided that when  $n=1$  and  $R_2-4$  are each H,  $R_1$  is not Me.

Prodn. of the copolyesters is by cultivating a polyester-accumulating micro-organism in an aq. medium on a water-soluble assimilable C-contg. substrate, at least part of the cultivation being under conditions of limitation for one or more of the essential requirements for microbial growth, excluding polyester accumulation. The characteristic feature of the process is that during at least a part of the time when such limitation holds the substrate comprises an organic acid (or salt) which is metabolisable to a polyester other than one composed only of (I) units.

By incorporation of (II) units the crystallinity and m.pt. of the prod. are reduced thus making it more suitable for melt processing e.g. to film. The copolyesters can also be used in amts. of 0.5-10 wt.% as processing aids of vinyl chloride polymers; random copolymers are esp. suitable for this use. (37pp)

Title Terms: HIGH; MOLECULAR; WEIGHT; CO; POLYESTER; PREPARATION; FERMENTATION; CONTAIN; HYDROXY; BUTYRIC; ACID; UNIT; UNIT; HYDROXY; ACID  
Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C08G-063/06; C08J-005/00; C08L-067/04

International Patent Class (Additional): C08L-023/26; C08L-023/34;

C08L-027/06; C08L-027/08; C08L-033/20; C08L-055/02; C08L-071/02;

C12P-007/42; C12P-007/62; C12R-001/05; C12R-001-05

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C; A05-E02; A08-M03; A10-A; D05-C

Plasdoc Codes (KS): 0004 0207 0209 0222 0230 0759 1291 1840 1985 2095 2148  
2150 2174 2272 2315 2513 2561 2585 2642 2661 2667

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 013 038 04& 061 062 063 143 144 157 195 239 255 311 314 318 344 347  
358 415 435 437 512 575 577 578 583 589 597 602 604 608 688

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-15604

(24)(44)公告日 平成6年(1994)3月2日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 63/06	N L P	7107-4J		
C 1 2 P 7/42		9282-4B		

発明の数2(全14頁)

(21)出願番号 特願昭56-185153  
(22)出願日 昭和56年(1981)11月18日  
(65)公開番号 特開昭57-150393  
(43)公開日 昭和57年(1982)9月17日  
(31)優先権主張番号 8 0 3 6 9 6 7  
(32)優先日 1980年11月18日  
(33)優先権主張国 イギリス(GB)  
(31)優先権主張番号 8 1 2 0 9 9 1  
(32)優先日 1981年7月7日  
(33)優先権主張国 イギリス(GB)  
  
審判番号 平3-23569

(71)出願人 999999999  
インベリアル・ケミカル・インダストリー  
ズ・ビーエルシー  
イギリス国 ロンドン市 エスタブリュー  
1 ビー・3 ジェイエフ、ミルバン  
ク、インベリアル・ケミカル・ハウス(番  
地なし)  
(72)発明者 ボール・アーサー・ホルムス  
イギリス国クリーブランド・ストックト  
ン・オン・テイズ・ノートン・ザ・グリ  
ーン・ノートン・ホール(番地なし)  
(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外2名)

審判の合議体  
審判長 和田 靖也  
審判官 柿沢 紀世雄  
審判官 池田 正人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】  $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】50~99モル%の $\beta$ -ヒドロキシブチレート繰返し単位と1~50モル%の $\beta$ -ヒドロキシバレレート繰返し単位を含み、50,000以上の重量平均分子量を有する $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体。

【請求項2】D(-)立体配置を有する請求項1記載の $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体。

【請求項3】200,000以上の重量平均分子量を有する請求項1または請求項2記載の $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体。

【請求項4】50~99モル%の $\beta$ -ヒドロキシブチレート繰返し単位と1~50モル%の $\beta$ -ヒドロキシバレレート繰返し単位を含み、10,000以上50,000未満の重量平均分子量とD(-)立体配置を有する $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体。

2

【発明の詳細な説明】

この発明は、ポリ $\beta$ -ヒドロキシ酪酸(以下PHBと略記する)に関する。

PHBは、多くの微生物、特に細菌、例えばアルカリゲネス属、アチオロジウム属、アゾバクター属、バシラス属、ノカルジア属、シュドモナス属、リゾビウム属およびスピリルム属の細菌によって、エネルギー貯蔵物質として蓄積される、式-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C(=O)-O-なる繰返し単位から構成される熱可塑性ポリエステルである。

10

この重合体は微生物を水性培地中で、エネルギーおよび炭素源として炭水化物またはメタノールのような適当な基質で培養することにより製造するのが便宜である。その基質は、もちろん、微生物によって資化されうるものでなければならない。重合体の蓄積を促進するため、培

BEST AVAILABLE COPY

養の少なくとも一部分は、当該微生物の繁殖にとって必須であるが、重合体の蓄積のためには要求されないある栄養源を制限した条件下で実施するのが好ましい。適当な培養方法の例は、欧州特許第15669号明細書および欧州特許出願第81.303373号明細書に記載されている。

このような方法で培養された微生物の細胞から抽出したPHBは、前記のような熱可塑性ポリエステルであり、このものは、急速に比較的高いレベルまで結晶化し、例えば70%またはそれ以上のオーダーである。この結晶化挙動は、重合体を例えば成形用材料として使用する

ときには、しばしば欠点となる。この発明により、PHBの結晶化は、重合体鎖に非類似単量体単位を組み入れることで変性できることが判明した。

下記の重合体合成を導く代謝経路の説明では、次の略号\*

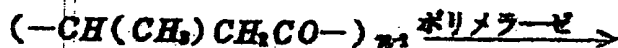
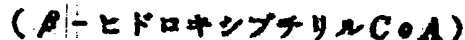
\*を用いた:

CoASHは、未エステル化補酵素Aである。したがってCH<sub>3</sub>COSCoAは補酵素Aのアセチルチオエステルで、一般にアセチルCoAと命名している。

NADPは、酸化状態のニコチンアミドアデニンヌクレオチドホスフェートである。NADPH<sub>2</sub>は、還元したNADPである。

微生物によるPHBの生合成における第1工程は、アセチルCoAの合成と考えられる。これは、例えば補酵素Aと酢酸エステル、またはビルベート〔(炭水化物のグリコリシス(解糖)生成物またはオキサロアセート(トリカルボン酸(TCA)サイクルまたはクレブサイクル)の一員である)の脱カルボキシル化で生成する)の脱カルボキシル化により形成される。

したがって、アセチルCoA源としての酢酸エステルで、PHBは次の反応を含む代謝経路で製造される:



ここで  $(-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}-)_{n-1}$  (n-1) 個の繰返し単位を含むPHBである。したがって、反応(4)は、 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}-$  単位を重合体鎖に附加する。

この発明により、ある種の有機酸の存在下に、一定条件下で微生物を培養することにより、重合体鎖に少割合の共単量体単位を導入できることが判明した。プラスチック材料として実用的用途のためには、重量平均分子量(Mw) 10,000以上(例えばゲル透過クロマトグラフィーで測定)でなければならない。

したがって、この発明により重量平均分子量10,000

0以上で繰返し単位

(I)  $-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}-$

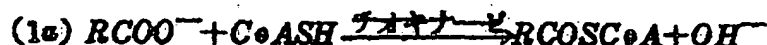
99.9ないし50モル%および繰返し単位

(II)  $-\text{OCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CO}-$

0.1ないし50モル%を有する共重合体を提供する。

用いる各酵素はある程度の非特異性を有しているので、このような共重合体が製造できる。

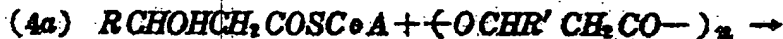
反応(1)に関与する酵素チオキナーゼは、広範な特異性を有し、チオキナーゼは次の反応により、補酵素Aを種々の他のカルボキシ基に結合させる:



酵素β-ケトチオラーゼが関与する反応(2)は、次のように示される:



この反応は一部特異的で、一方の反応体はアセチルCoAでなければならない。したがって、一般的な反応は、次の通りである:



(RとR'とは異つていてもよい)

したがって、このルートは、次の単位を含む重合体になる:

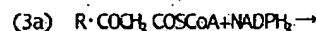


(R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>はそれぞれ水素原子)



同様に、反応(3)のレグクターゼ酵素の特異性は、変性し次のようにして一般式RCOCH<sub>2</sub>COSC<sub>2</sub>の脂肪族アシルチ

10 オエステルを還元する:

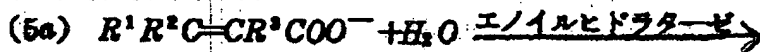


反応(4)のポリメラーゼ酵素は、絶対特異性ではない。

\* 一般的反応は、次のように示される:

※もし、若干の繰返し単位中、R<sup>1</sup>がメチルでなければ、20 共重合体を得られる。

反応(4a)の反応体であるβ-ヒドロキシチオエステル、例えばRCHOHCH<sub>2</sub>COSC<sub>2</sub>は、場合により、非特異性脂肪酸代謝酵素エノイルヒドラターゼにより触媒される反応によつても製造される:



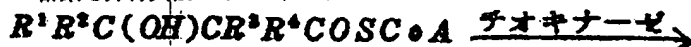
〔反応(5a)、(5b)は、逆にすることもできる、即ち炭素-炭素二重結合の水素化は、チオエステル化反応の後に起きてよい〕。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、必ずしも水素原子でなくてもよい。

したがって、反応(5a)、(5b)および(4a)を用いて、次式の単位を重合体鎖に導入することもできる:

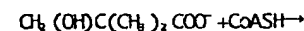


即ち、単位-OCR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>O- (R<sup>4</sup>=H)。したがって、もしR<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>がそれぞれ水素原子でなく、繰返し単位R<sup>1</sup>の若干がメチル基でなければ、共重合体を得られる。

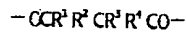
反応(4a)のポリメラーゼ酵素も非特異性であつて、a★



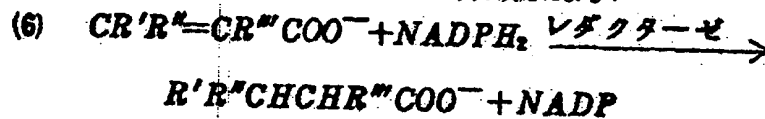
例えば、β-ヒドロキシ酪酸はβ-ヒドロキシブチリルCoAを与え、ビバリン酸はビバリンCoAを与える:



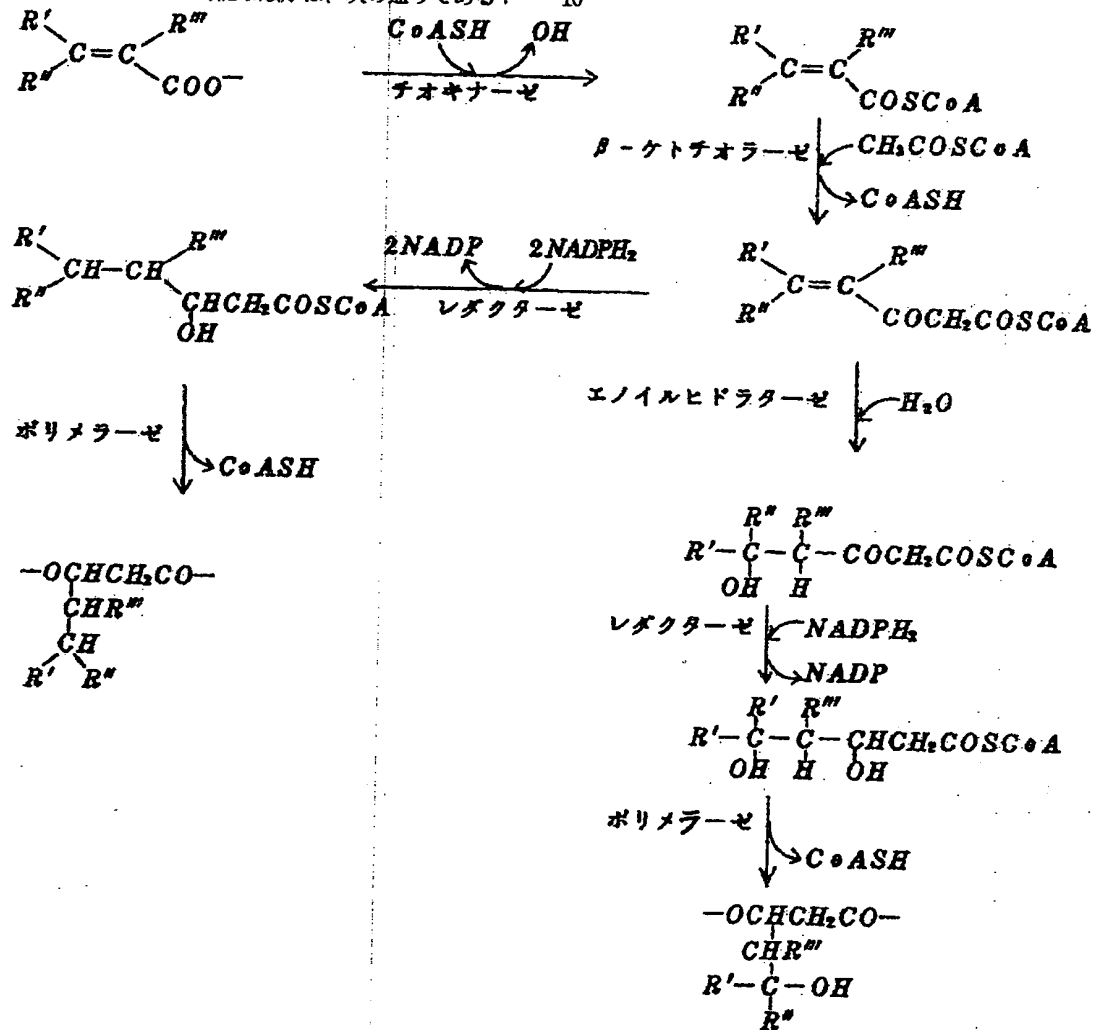
このような反応体は、次の一般式の単位



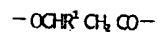
を重合体に導入し、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子で、繰返し単位  $R^1$  の若干がメチル基でなければ、共重合体を得られる。



したがって、一つの可能な順序は、次の通りである： 10



したがって、これらのルートは、次の単位を含む共重合体を与える：



即ち  $-OCH(R^2)CH_2CO-$

この場合  $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は、それぞれ水素原子で、 $R^1$  は

$-CH(R'')CH_2CO-$  および/または  $-CH(R'')C(OH)R' R''$  である。

共重合体中の繰返し単位IIの割合は、共重合体の全繰返し 50

\* 不飽和酸では、反応 (5a) の代りに反応 (5b) が起き、重合体合成は反応 (2a) および (3a) を含むルートの外に、例えば反応 (5a) による炭素-炭素二重結合の水素化または炭素-炭素二重結合の還元により進行し、例えば次の反応による：

し単位の0.1ないし50モル%、特に1ないし40モル%である。場合によっては、微生物により得られる重合体は、繰返し単位Iのホモ重合体と繰返し単位IおよびIIを含む共重合体との混合物である。この場合、重合体中の繰返し単位IIの全体の割合は、全繰返し単位の0.1ないし50モル%である。好ましくは、繰返し単位IIの割合は、3ないし30モル%である。

この発明により、上記の反応のコースに従う代りに、微生物は、上記の反応に加えてまたはその若干の代りに脱

離反応を行い、3-位置のヒドロキシ基を介して重合体鎖に結合したβ-ヒドロキシバレリン酸単位を含む重合体を与える。したがって、共重合体は、単位-OCH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)CH<sub>2</sub>CO-を含んでいる。

β-ヒドロキシ酪酸単位、即ち次の単位  
-OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CO-

および他の単位を含むある種の重合体は、既に文献に記載されている。

エチレン性不飽和を示す赤外バンドを示す重合体が、DavisによりApplied Microbiology 12 (1964) p. 301~304に発表されている。Davisによれば、β-ヒドロキシ酪酸単位および次の3-ヒドロキシ-2-ブテノン酸単位

-OC(CH<sub>3</sub>)=CHCO-

を含む共重合体であるとされているこれら重合体は、Nocardiaをn-ブタンに培養して製造できる。

Waller等はEnvironmental Science and Technology 6 (1972) p. 161~164および8 (1974) p. 576~579に、活性汚泥から分離し反覆洗浄後融点97~100℃で、β-ヒドロキシ酪酸単位および次のβ-ヒドロキシバレリン酸単位

-OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CO-

を1:5の比で含む重合体を発表している。

Marchessault等は、IUPAC Macro Florence 1980 International Symposium on Macromolecules Preprints 2 (1980) p. 272~275に、この化合物の研究を報告し、主としてβ-ヒドロキシバレリン酸単位を含むことを確認している。

USP 3275610には、ある種の微生物、特にNocardia salmonicolorを炭素数4個を含むカルボン酸に培養するポリエステル微生物学的製造法が示されている。実施例2および3では、それぞれ3-ブテノン酸およびα-ヒドロキシ酪酸を用い、重合体は示された融点の178~184℃のオーダーからポリβ-ヒドロキシ酪酸である。しかし、実施例1では、2-メチルアクリル酸(メタクリル酸)を用い、得られる重合体は固定していないが、融点215~220℃を有しかつメチルエチルケトンに可溶性と説明されている。これに対し、この発明の主としてβ-ヒドロキシ酪酸残基を含む共重合体は、融点180℃以下で冷メチルエチルケトンに不溶性である。

PHB蓄積性微生物を、適当な基質、即ちエネルギーおよび炭素源に好氣的に培養すると、微生物は増殖のための必須要件の一つまたはそれ以上が消費されるまで増殖する。以下においてこの微生物の増殖を、“繁殖”と称する。繁殖必須要件の一つが消費されたとき、その後の繁殖は、もしあつたとしても極めて限られた程度であるが、基質は消費されない限り、PHBは微生物に蓄積される。

ある種の微生物では、PHB誘発抑制因子、例えば1つ

またはそれ以上の繁殖必須要件の制限が存在しなくても、微生物の繁殖中にPHBは蓄積するであろう；しかし、このように蓄積したPHBの量は一般に少量で、代表的には得られる細胞の約10wt%以下である。したがって、バッチ式培養で繁殖したとき、1つまたはそれ以上の繁殖必須要件が消費されるまでは、殆んどPHB蓄積なしで微生物は繁殖し、その後微生物はPHBを合成する。

この発明により、共重合体を製造するために、繁殖のための必須要件の1つまたはそれ以上の量を抑制するが、PHB蓄積は制限しない条件下での微生物の培養中、基質の少なくとも一部として一般に共単量体単位になる酸を用いる必要があることが判明した。繁殖の必須要件の制限を行わないときは、一般に酸は微生物により別の経過で代謝され、例えばアセチルCoAまたはTCAサイクルの一員になり、共重合体は製造されなくなる。したがって、一例として、何らの繁殖制限なしではプロピオン酸は微生物により代謝され、プロピオニルCoAを経て炭酸ガスを取り込みメチルマロニルCoA、次いでTCAサイクルの一員であるサクシネートになる。

したがって、この発明により、ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性炭素含有基質の水溶性培地で、培養の少なくとも一部は微生物繁殖の1つまたはそれ以上の必須要件を制限するがポリエステル蓄積は制限しない条件下で培養を実施して、熱可塑性ポリエステルを製造する方法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により、-OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CO-繰返し単位のみよりなる以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法を提供する。

この点に関し、前記のUSP 3275610では得られる細胞の量は、繁殖制限が行われなかつたような量である。

基質および酸素(これは一般に醗酵器の水溶性培地に空気を注入して供給される)に加えて、各種の栄養塩類が微生物が繁殖でかきために必要である。したがって、一般に同化できる形態の次の元素源(普通は水溶性塩)が必要である：窒素、リン、イオウ、カリ、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄とともに微量元素、例えばマンガン、亜鉛および銅。酸素の醗酵器への供給を制限してポリエステル蓄積を誘発することも可能であるが、1種またはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのに最も実用的な元素は、窒素、リンであり、好ましくないのはマグネシウム、イオウまたはカリである。これらの中でも、窒素(これはアンモニウム塩で供給するのが便利である)の量を制限するのが最も好ましい。必要とする同化性窒素の量は、ポリエステル蓄積の少ない細胞の所望重量の約8~15%である。醗酵は、水性培地1g当たりポリエステル含有細胞の乾燥重量が少なくとも5gになるように行うのが好ましい。

したがって、もし例えばPHB含有量4.0wt%のPHB含有細胞を10g/ℓで作ろうとすれば、細胞繁殖量制限に用いるのに醗酵器に供給する必須栄養の量は、PHBを含まない細胞6g/ℓの繁殖を支持するのに要する量である；したがって、もし窒素を繁殖制限栄養として用いれば、PHBを含まない細胞の窒素含有量は約8~15wt%であるから、必要な同化性窒素の量は約0.5~0.9g/ℓであり、例えばアンモニウムイオン0.6~1.2g/ℓである。

醗酵は、例えばpH、温度および曝気（酸素を制限栄養源としないとき）を微生物に対し常用する条件下で行う。同様に、用いる栄養塩類（その使用量は上記の条件を考慮して決定した、繁殖制限栄養源以外）は、微生物の繁殖に通常用いる量である。

微生物は、容易に代謝できる基質、例えば炭水化物に対し、重合体蓄積段階で制限すべき繁殖用に必要な充分の栄養源の存在下に、培養により所望の重量まで繁殖させるのが好ましい。場合により、繁殖段階の少なくとも一部、また場合によっては全部に対する基質は、重合体蓄積段階で繰返し単位IIになる酸である。

醗酵は、繁殖には必要であるが重合体蓄積には必要でない栄養源の量が消耗したときに、重合体蓄積が起こるバッチ式醗酵で行われる。別法として、醗酵は、新鮮な水性培地および基質の添加速度に対応する速度で、醗酵容器からバクテリア細胞を含む水性培地を連続的または間欠的に除去する連続式醗酵で行う。醗酵容器に供給する制限した栄養源の量は、容器から除去した水性培地がこの栄養源を殆んど含みぬような量で、容器から除去した水性培地を、次いでバッチ式または好ましくは連続式で操業する第2醗酵容器に供給し、共重合体生産性酸を含む新鮮な基質の添加で、通気培養を継続して重合体蓄積を起こさせる。この追加醗酵工程で、追加量の基質および栄養塩類を添加するが、追加繁殖は一般に好ましくない。したがって、制限繁殖に用いる栄養源は加えるべきではない。しかし、第1醗酵器から別の1個またはそれ以上の醗酵器に供給した水性培地に、制限栄養源が若干の残留量を含むことおよび/またはその少量を添加することが、効果的な操業に好ましい。

上記のバッチ式または連続式の何れの場合も、共重合体繰返し単位IIを与えるのに用いる酸は、繁殖に必要な栄養が消耗したときに起きる、重合体蓄積段階中の基質の一部または全部として用いる。この酸は、反復単位Iを与える基質、例えば炭水化物との混合物で用いるか、または唯一の基質が用いられる；後者の場合、十分な酸が、アセチルCoAへの別の経路で代謝されて繰返し単位Iを与え、もし別の経路が反応(2a)を含めば、繰返し単位IIを得るのに必要な任意のアセチルCoAが用いられる。しかし、酸が唯一の基質であれば、重合体収量は往々にして低下する。

繰返し単位IIを与える酸は、重合体蓄積段階の一部のみに存在させることもできる；酸が存在する重合体蓄積段階の部分の前および/または後に起きる、重合体蓄積段階の残りでは、繰返し単位Iのみを与える基質が、唯一の基質である。

場合によつては、この経路に必要な酸素をブロックすることおよび/または必要な酵素合成の能力のない微生物を用いることにより、酸のアセチルCoAへの通常の代謝を阻止することも可能である。しかし、実質的収量の重合体を得るために、繁殖に要する栄養を制限し、好ましくは消耗した条件下での一定期間の培養が、一般に好ましい。

醗酵は、蓄積したポリエステルの量が、バクテリア細胞の約50~80wt%になるように行うのが好ましい。

共重合体を得るのに用いられる酸は、培養が繁殖制限状態であるとき、繰返し単位Iのみにならないものである。

したがって、不適当な酸には酢酸およびβ-ヒドロキシ酪酸、TCAサイクルのメンバー、および培養が繁殖制限状態になるとアセチルCoAのみを与える酸および/またはTCAサイクルのメンバーである。

したがって、不適当な酸には、ホスホグリセリン酸、ピルビン酸、クエン酸、イソクエン酸、α-ケトグルタン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、オキサロコハク酸、アコニツト酸およびメチルマロン酸がある。アミノ酸も、同様に不適当である。β-酸化によつてβ-ヒドロキシ酪酸になる酪酸も、同じく不適当である。酵素チオキナーゼは補酵素Aを脂肪酸エステルに附加しないので、脂肪酸は共重合体を与えない。

適当な酸は、プロピオン酸、イソ酪酸、これらおよび酪酸のハロまたはヒドロキシ置換誘導体、例えば3-クロロプロピオン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、α-ヒドロキシ酪酸（β-ヒドロキシ酪酸は不適当）、ピバリン酸、ハロ酢酸、フェニル酢酸および安息香酸、およびこれらの不飽和酸またはハロ置換誘導体、例えばアクリル酸、メタクリル酸（2-メチルアクリル酸）、3,3-ジメチルアクリル酸、2,3-ジメチルアクリル酸、3-クロロプロピオン酸および2-クロロプロピオン酸である。

基質は水溶性でなければならず、酸は水溶性であればそのまま、または水溶性塩例えばアルカリ金属塩で添加する。上記の通り、場合によつては、微生物はさらに酸との反応を行うこともある。したがって、イソ酪酸  $n=1$ ,  $R^2=R^3=R^4=H$ ,  $R$  = イソプロピル基の繰返し単位IIを与える。  $n=1$ ,  $R^2=R^3=R^4=H$ ,  $R^1$  = エチル基の繰返し単位IIがあり、微生物が共重合体への代謝経路中で、メチル基を水素で置換することを示している。

種々の酸に対する、繰返し単位IIの  $n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  および  $R^4$  は次の通りである。



酸	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	n
プロピオン酸	エチル*	H	H	H	1
イソ酪酸	イソプロピル*	H	H	H	1
3-クロロプロピオン酸	2-クロロエチル***	H	H	H	1
3-ヒドロキシプロピオン酸	水素または2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
アクリル酸	水素または2-ヒドロキシエチル**	H	H	H	1
3,3-ジメチルアクリル酸	メチルまたは2-メチルプロピル*または2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル	メチル	H	H	1
		H	H	H	1
		H	H	H	1
2,3-ジメチルアクリル酸	メチルまたは1-メチル-2-ヒドロキシプロピルまたは1-メチルプロピル*	H	メチル	H	1
		H	H	H	1
		H	H	H	1
2-メチルアクリル酸	水素またはイソプロピル*または1-メチル-2-ヒドロキシエチル	H	メチル	H	1
		H	H	H	1
		H	H	H	1
3-クロロプロピオン酸	Clまたは2-クロロエチルまたは2-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
		H	H	H	1
2-クロロプロピオン酸	水素または1-クロロエチルまたは1-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H	Cl	H	1
		H	H	H	1
		H	H	H	1
クロロ酢酸	クロロメチル****	H	H	H	1
α-ヒドロキシ酪酸	エチル	H	—	—	0
ピバリン酸	水素	H	メチル	メチル	1

註:

\* エチル存在

\*\* 2-ヒドロキシエチル存在

\*\*\* エチルおよび2-ヒドロキシエチル存在

\*\*\*\* メチル存在

使用できる微生物は、共重合体を製造しようとする酸またはその塩を同化できる任意のポリβ-ヒドロキシ酪酸蓄積性微生物である。バクテリア *Alcaligenes eutrophus* (従来は *Hydrogeno-monas eutropha* として知られていた) 種、例えばこの種の学術的研究に広く用いられた H 16 株、(ATCC No. 17699, J. General Microbiology (1979) 115, p. 185~192 参照) および H 16 株の変異株、例えば 11/7B, S301/C5, S501/C41 (それぞれ the National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, 1980年8月18日に寄託した, NCIB No. 11600, 11599, 11597 および 11598) が特に適している。ATCC 番号は、the American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852 U.S.A. で与えられ

た番号である。上記の通り、繁殖段階中、炭水化物を基質として用いるのが好ましい。 *Alcaligenes eutrophus*

H 16 株 (ATCC No. 17699) は、グルコースを資化しないが、その変異株例えば上記の 11/7B, S301/C5, S501/C29 および S501/C41 は、グルコースを資化できる。炭水化物、特にグルコースは、コストの面および微生物が効果的に繁殖できるので、繁殖段階での好ましい基質である。

ポリエステルは、微生物細胞内部の顆粒として製造される。ポリエステルを含有する細胞は、例えば USP 3-107172 に示すように、そのまま成形材料として用いられるが、一般にポリエステルを、バクテリア細胞から分離するのが好ましい。これは、細胞を細胞崩壊、次いで適当な溶剤でポリエステルを抽出することで達成される。適当な抽出処理の例は、ヨーロッパ特許出願第 1

5123号に記載されている。

上記の通り、重合体が実用できるためには、ゲル透過クロマトグラフィーで測定した重量平均分子量 (Mw) 10,000以上でなければならない。

好ましくは、Mwは50,000以上、より好ましくは100,000以上、特に200,000以上である。

共重合体は、常にD-立体配置を有し、β-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体よりも低い融点を示す。

共重合体は、溶融成形品の製造に特に有用であり、この場合β-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体に匹敵する還元結晶化度が好ましい。

特に興味深いのは、少量の共重合体の塩化ビニル系重合体の高分子量加工助剤としての用途である。この応用では、共重合体の量は、塩化ビニル重合体に対し0.5~10wt%である。最良の結果を得るには、共重合体はランダムでなければならない。ランダム共重合体を得るには、共単量体単位IIを得るのに用いる酸は、少なくとも繁殖要件制限条件下での微生物の培養期間を通じて唯一の基質として存在するのが好ましい。

共重合体は、溶融押出し後、好ましくは重合体のガラス転移点 (Tg) と融点との間の温度で、一対またはそれ以上のロールを通過させて、フィルムの厚さを減少しかつ若干の分子配向を導入するフィルムの製造にも用いられる。

この発明を、以下の実施例で説明する。

#### 実施例 1.

プロピオネートの通常の代謝では、プロピオネートはサクシネートに変換し、これはTCAサイクルのオキサロ酢酸への酸化、次いで脱カルボキシル化によりアセチルCoAになる。オキサロ酢酸の脱カルボキシル化では、両方の末端炭素は炭酸ガスとして除去される。したがって、もしカルボキシル基に放射性ラベルした炭素原子を有するプロピオネート、即ち1-<sup>14</sup>C-プロピオネートを、アセチルCoAへの細胞変換に供給すれば、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>として放射能は失われる。重合体への何らかの<sup>14</sup>Cの組み込みは、プロピオニルCoAのβ-ヒドロキシバレルルCoAへの変換、引き続き重合からもたらされる。

*Alcaligenes eutrophus* 変異株NCIB11599を、3.5 g/ℓの蓄積ポリエステルを支持するに充分な同化性窒素および基質としてのグルコースを含む水性培地Aを用いるバッチ式醗酵器で、通気培養により繁殖させた。水性培地Aは、脱イオン水1ℓ当り次の組成を有していた。

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.8 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.45 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1.1M)	12 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15 mg
微量元素溶液	24 ml

微量元素溶液は、脱イオン水1ℓ当り次の組成を有して

いた。

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.02 g
ZnSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1 g
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.6 g

生体濃度が4.5 g/ℓに達したとき、即ち系の同化性窒素が枯渇した後、1-<sup>14</sup>C-プロピオネートを含むプロピオン酸ソーダ1 g/ℓをグルコースとともに醗酵器に加え、醗酵を5分間継続した。次いで、細胞をろ過により回収し、重合体をクロロホルムで抽出した。ラベルした炭素は、殆んど完全にクロロホルム溶液にあり、ラベルした末端炭素原子が炭酸ガスとして損失しなかつたことを示した。したがって、少なくとも幾らかのプロピオネートは、代謝されてアセチルCoAになることなく重合体に組み込まれた。

#### 実施例 2. (比較例)

*Alcaligenes eutrophus* 変異株NCIB11599を、脱イオン水1ℓ当り次の組成を有する水性培地B400mlを含む5ℓバッチ式醗酵器で、pH6.8、34°Cで通気培養により繁殖させた。

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.8 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.45 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1.1M)	12 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15 mg
実施例1で用いた	24 ml

#### 微量元素溶液

グルコースを、8 g/hrの割合で醗酵器に供給した。培地Bの同化性窒素の量は、PHBを含まない26 gの細胞の生存を維持するに充分であつた。

40時間後、細胞を遠心分離で回収した。細胞を凍結乾燥し、重合体をクロロホルムで抽出した。

#### 実施例 3.

実施例2を繰返したが、細胞重量34 gに達したとき、グルコースの代りにプロピオン酸を2.8 g/hrの割合で醗酵器に供給した。

#### 実施例 4.

実施例3を繰返したが、プロピオン酸の供給は細胞重量39 gに達したときに開始した。

#### 実施例 5.

実施例3を繰返したが、プロピオン酸の供給は、細胞重量56 gに達したときに始めた。

#### 実施例 6.

実施例3を繰返したが、細胞重量48 gに達したとき、プロピオン酸12 gを一度に添加した。

#### 実施例 7.

実施例2を繰返したが、培地Aを用い、グルコースの代りにプロピオン酸を4 g/hrの割合で、醗酵中を全体を通じて供給した。

#### 実施例 8.

実施例2を繰返したが、細胞重量が38gになつたとき、グルコースの代りに、グルコース5.2g/hr、プロピオン酸2.8g/hrの割合で、グルコースおよびプロピオン酸の混合物を醗酵器に供給した。

#### 実施例 9

実施例8を繰返したが、細胞重量28gに達したとき、グルコース6.8g/hrおよびプロピオン酸1.2g/hrの割合で、混合物の供給を開始した。

実施例2～9では、プロピオン酸は400g/lを含む溶液として添加した。

#### 実施例 10.

実施例2を繰返したが、細胞重量が28gに達したとき、グルコースの代りにイソ酪酸を醗酵品に2g/hrの割合で供給した。イソ酪酸は、150g/lを含む溶液で添加した。

実施例3～6および8～10では、醗酵器に供給した酸の重量対細胞重量が26gに達した後（即ち系の窒素が枯渇したとき）に醗酵器に供給したグルコースの重量および醗酵器に供給した酸の重量の合計の比が、第1表に示す値に達するまで、醗酵を継続した。

#### 実施例 11.

実施例2を繰返したが、細胞重量が26.4gに達したとき、グルコースの代りに3クロロプロピオン酸を4g/hrの割合で5時間醗酵器に供給した。

#### 実施例 12

実施例11を繰返したが、3-クロロプロピオン酸の供給は、細胞重量34.4gに達したときに開始した。

#### 実施例 13.

実施例12を繰返したが、細胞重量30gに達したとき、3-クロロプロピオン酸4gを一度に添加し、次いでグルコースを6.8g/hrの割合で7時間供給した。

実施例11～13では、3-クロロプロピオン酸は、50g/lを含む溶液で添加した。

#### 実施例 14.

実施例2を繰返したが、細胞重量31gになつたとき、グルコースの代りにアクリル酸を4g/hrの割合で5時間醗酵器に供給した。アクリル酸は、100g/lを含む溶液で添加した。

第 1 表

実施例	酸	酸供給比 (%)	最終細胞濃度 (g/l)	細胞中の重合体の量 (wt%)
2	なし	0	20.0	70
3	プロピオン酸	75	15.6	70
4	プロピオン酸	50	13.3	60

実施例	酸	酸供給比 (%)	最終細胞濃度 (g/l)	細胞中の重合体の量 (wt%)
5	同上	33	16.0	70
6	プロピオン酸	4	13.0	63
7	同上	100	6.4	55
8	プロピオン酸	17	13.6	55
9	同上	9.5	14.2	67
10	イソ酪酸	66	13.0	50
11	3-クロロプロピオン酸	61	7.4	25
12	3-クロロプロピオン酸	33	4.5	20
13	同上	6.5	9.3	35
14	アクリル酸	50	6.0	25

註\* 酸供給比は、醗酵器に供給した酸の重量を、細胞乾燥重量26gに達した後に添加したグルコースの重量および醗酵器に供給した酸の重量の合計で除した商である。

実施例2～14の重合体の共単量体単位の量は、(a)加水分解およびガスクロマトグラフィおよび(b)<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトロスコープにより決定した。

重合体の分子量は、ゲル透過クロマトグラフィで決定した。

塩素分析も、実施例2、11、12および13の重合体について行つた。

結果を第2表に示した。

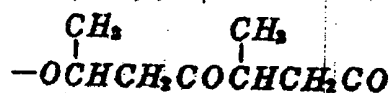
3-クロロプロピオン酸からの塩素は、殆んど重合体に見出されなかつた。したがつて、3-クロロプロピオン酸の代謝中にHClが失われて、得られる炭素-炭素二重結合は、水素化および水和されて、予期された2-クロロエチル基の代りに、R<sup>1</sup>としてエチルおよび2-ヒドロキシエチル置換基になつた。しかし、実施例11～13の重合体の塩素含有量は、若干の塩素が2-クロロエチル基として存在することを示している。

第 2 表

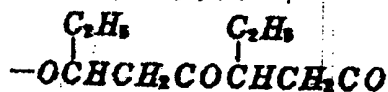
実施例	酸	R <sub>1</sub>	単位IIのモル%		分子量		塩素
			NMRによる	加水分解およびガスクロマトグラフィによる	M <sub>w</sub> × 10 <sup>-3</sup>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	
2	なし	—	0	0	292	2.75	265
3	プロピオン酸	エチル	27	33	207	4.23	
4	プロピオン酸	エチル	24	27	374	1.89	
5	同上	エチル	13	14	258	3.50	
6	プロピオン酸	エチル	6	3	348	1.66	
7	同上	エチル	25	26	336	1.70	
8	プロピオン酸	エチル	15	14	389	1.67	
9	同上	エチル	6	7	243	2.56	
10	イソ酪酸	エチル	30	29	274	2.38	
11	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	7 1.8	— —	383	2.99	475
12	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	4 1.2	— —	376	1.77	265
13	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	2 0.6	— —	311	1.99	45
14	アクリル酸	2-ヒドロキシエチル	6.5	—	353	2.36	

高分解能<sup>13</sup>C NMRを用いて、実施例3～10の共重合体の単体序列を調べた。カルボニル基の炭素原子から得られるシグナルは、その環境に応じて、異なる化学シフトで起きることが判明した。したがって、単位IおよびII (n=1, R<sup>1</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=H)を含む重合体では、可能な序列は次の通りである。

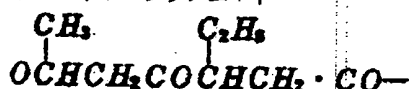
A. ブチレート-ブチレート



B. ペンタノエート-ペンタノエート



C. ブチレート-ペンタノエート



実施例2～10の重合体のNMR検査は、それぞれ169.07、169.25および169.44 ppmで起きる3個の共鳴を示した。M. Iida外 [Macromolecules 11 (1978) p 490]によれば、169.07 ppmでの共鳴は、ブチレート-ブチレートの序列Aであり、169.44 ppmはペンタノエート-ペンタノエートの序列Bである。推論によれば、169.25 ppmでのシグナルは、ブチレート-ペンタノエートの序列Cから生じ

る。

実施例10の重合体のNMRの結果の定量的分析は、次の結果を与えた。

序列A (ブチレート-ブチレート) 55%

序列B (ペンタノエート-ペンタノエート) 14%

30 序列C (ブチレート-ペンタノエート) 31%

これらの結果は、実施例10の重合体が単位IおよびII (n=1, R<sup>1</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=R<sup>4</sup>=H)の共重合体を実質的量で含むことを、明らかに示している。しかし、繰返し単位Iのホモ重合体の若干も存在する可能性がある。

実施例2～14の重合体は、全部D(−)立体配置を有していた。なお、このD(−)立体配置において、Dはフィッシャーの投影式による立体配置の系列を意味し、(−)は当該化合物が偏光面を左へ回転させることを意味する。

40

抽出したままの共重合体の熱的挙動は、コンピューターデータ分析付のジュボン1090システムを用いて、まず示差走査測熱法(DSC: differential scanning calorimetry)で決定した。DSCを、190℃で圧縮成形し、完全に結晶化した製品を得るために、プレス中に冷却した後の試料でも実施した。それぞれの場合、見本は空気中で20℃/分で加熱し、スタート時の温度(T<sub>s</sub>)および溶融吸熱量のピーク時の温度(T<sub>p</sub>)をその面積とともに記録した。アニーリングした試料の加熱を200℃まで継続し、完全に溶融させるため1分間

等温にした後、試料を液体窒素中で急冷した。非晶領域のガラス転移温度 ( $T_g$ ) を決定するために、DSC を再び行った。最後に、密度勾配浮遊法により、アニーリングした共重合体の密度を測定した。なお、密度勾配浮遊法

\* 遊法とは、メスシリンダー中に密度の異なる二つ以上の溶融を使用して連続的な密度勾配をもつ液を作り、この密度勾配管を用いてポリマーの密度を測定する方法である。

第 3 表

実施例	抽出重合体のDSC			アニーリングした重合体のDSC				密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
	$T_g^\circ\text{C}$	$T_p^\circ\text{C}$	面積( $\text{J}/\text{g}$ )	$T_g^\circ\text{C}$	$T_g^\circ\text{C}$	$T_p^\circ\text{C}$	面積( $\text{J}/\text{g}$ )	
2	140	183	100	5.9	140	191	127	1.256
3	120	125 166	5 20	-1.9	140	171	18	1.172
4	120	170	50	0.8	140	182	44	1.174
5	110	120 170	5 50	2.2	140	177	45	1.200
6	120	172	100	2.7	120	173	96	1.225
7	80	132	34	0.4	80	132	40	1.198
8	110	120 166	6 60	2.0	140	174	43	1.199
9	110	166	89	4.0	110	163	81	1.210
10	50	65 120 166	10 3 25	-2.0	130	172	26	1.138
11	110	170	57	5.0	120	180	73	—
12	110	177	86	4.1	120	173	86	1.182
13	100	172	98	5.9	120	171	96	1.218
14	110	172	84	2.7	110	174	75	1.212

共重合体の広い融点範囲は、共重合体がむしろ不均質組成物であることを示している。しかし、溶融加熱がよりシャープになりかつ面積が僅かに減少しているため、アニーリングしたとき、エステル交換による顕著なランダム化が起きている。このことは、重合体はホモ重合体の物理的混合物でなく、真の共重合体の指標である。

多くのDSCピークが、実施例3、5、8および10の抽出したままの重合体で観察された。

溶融吸熱面積は、結晶化度の指標である。アニーリング後の実施例3～14の重合体は、全部実施例2の対照ホモ重合体よりも、著るしく結晶化度は低かった。

#### 実施例 15.

*Alcaligenes eutrophus* 変異株 NCIR11599 を、水性培地C (これは培地Bと同じであるが、PHBを含め細胞  $8.5 \text{ g}/\ell$  を支持するのに十分な硫酸アンモニア  $5.2 \text{ g}/\ell$  であった)  $4000 \text{ ml}$  を含む5ℓバッチ式酸酵器で、 $\text{pH} 6.8$ 、 $34^\circ\text{C}$  で通気培養により繁殖させた。

基質は、 $5.5 \text{ g}/\ell/\text{hr}$  の割合で供給するグルコースであった。細胞濃度が  $7 \text{ g}/\ell$  に達したとき、グルコー

スに加えてプロピオン酸を  $1.58 \text{ g}/\ell/\text{hr}$  の割合で供給した。細胞乾燥重量が  $15 \text{ g}/\ell$  に達したとき、細胞を回収した。細胞懸濁液を慎重乾燥し、脂質を乾燥細胞のメタノール還流で抽出し、重合体をクロロホルム還流で抽出した。クロロホルム溶液をメタノール/水混合物に添加する沈澱法により、重合体を回収した。

共重合体は、反復単位  $\text{II}$  ( $\text{R}=\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{R}^2=\text{R}^3=\text{R}^4=\text{H}$ ,  $n=1$ )  $20$  モル% を含んでいた。共重合体は分子量  $350,000$  を有し、冷メチルエチルケトンに不溶性であった。共重合体  $2 \text{ g}$  を、メチルエチルケトン  $100 \text{ ml}$  で1時間還流すると、全量溶解した。溶液を冷却すると、ゲル状マスを生じた。これに対し、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸のホモ重合体  $2 \text{ g}$  をメチルエチルケトン  $100 \text{ ml}$  と還流したとき、溶解したホモ重合体は  $0.1 \text{ g}$  以下であった。メチルエチルケトンの代りにエタノールで、溶解度テストを反覆すると、1時間還流後、共重合体約  $0.7 \text{ g}$ 、ホモ重合体  $0.04 \text{ g}$  以下が溶解した。

これに対し、Waller 外により *Environmental Science and Technology* 8 (1974) p. 576~579 に記載の重合体は、熱エタノールに可溶性とされている。

## 実施例 16.

水性培地D、EおよびFを脱イオン水1ℓ当り次の組成で作った。

## 培地D

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1.5 g
$\text{CaCl}_2$	0.12 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.006 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.006 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0015 g
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (濃厚)	1 ml

## 培地E

$\text{H}_3\text{PO}_4$ (1.1M)	2.4 ml
グルコース	40 g

## 培地F

$\text{H}_3\text{PO}_4$ (1.1M)	2.4 ml
プロピオン酸	40 g

消毒した公称容量250ℓバッチ式醗酵器に、培地DおよびEのほぼ等容量混合物を、130ℓのマークまで満たした。醗酵器中の培地の少量の試料で、窒素含有量を分析した。次いで、培養器にAlcaligenes eutrophus変異株NCIB1599を接種し、醗酵を34℃で、苛性ソーダ溶液の添加でpH6.8に自動的にコントロールして好氣的に行つた。

醗酵器に存在した同化性窒素の量は、PHBを含め細胞約1.2kgのみまでの微生物繁殖を行うのに充分であつた。細胞重量が約1.05kgに達したとき、培地Eの供給を、6.5ℓ/hrの割合で開始した。

細胞重量が約1700gに達したとき、培地Eの供給を停止し、培地Fの供給を6.5ℓ/hrの割合で開始し、細胞約2.6kgが製造されるまで醗酵を継続した。

次いで、細胞懸濁液を、遠心分離により濃度約60g/ℓまで濃縮し、懸濁液1容量を、1,2-ジクロロエタン(DCE)2容量とシルバーソンミキサーで20℃で15分間接触させて重合体を抽出した。DCE相を、細胞の残骸を含む水性相から分離し、伊過したDCE相1容量を、メタノール/水(4/1、容量)混合物4容量に加えて、重合体を沈澱させた。沈澱重合を伊別し、メタノールで洗浄してから、オーブンで100℃で4時間乾燥した。

重合体は、DSCで決定して溶融吸熱での168℃のピークを有し約100~180℃の溶融範囲を有していた。

## 実施例 17.

実施例16の醗酵処理を反覆したが、培地Eの供給から培地Fの供給への切換えは、細胞重量が約3.5kgに達したときに行つた。培地Fは、11.4ℓ/hrの割合で4時間供給してから3.2ℓ/hrに低下させてこのレベルをさらに9時間維持し、この段階で細胞重量は約3.9

kgであつた。

この実施例では、醗酵器に存在した同化性窒素の量は、重合体を含め細胞約1.5kgのみに微生物を繁殖させるに充分であつた。

細胞懸濁液を遠心分離で濃縮し、次いで実施例15の方法で、重合体を濃縮細胞懸濁液から抽出した。

## 実施例 18.

実施例16のようにして、250ℓ醗酵器に装入、接種を行つた。同化性窒素の量は、重合体を含め細胞約

10 1.9kgのみに、微生物を繁殖させるに充分であつた。実施例16のようにして、醗酵を34℃、pH6.8で好氣的に行つた。

細胞重量が約1.0kgに達したとき、培地Eおよび培地Gをそれぞれ8.7ℓ/hrおよび4.8ℓ/hrの割合で供給を開始し、細胞重量が3.9kgになるまで継続した。

培地Gは、脱イオン水1ℓ当り次の組成を有していた：

$\text{H}_3\text{PO}_4$ (1.1M)	1.2 ml
プロピオン酸	20 g

20 細胞懸濁液を遠心分離で濃縮し、実施例15の方法で、重合体を濃縮細胞懸濁液から抽出した。

## 実施例 19.

実施例17の処理を大規模で反覆し、公称容積1000ℓの醗酵器を用い、ほぼ等容量の培地DおよびEで500ℓマークまで満たした。この実施例では、培地Eの供給は細胞重量約4kgになつたときに25ℓ/hrの割合で開始し、培地Fの供給は細胞重量約8kgになつたとき37.5ℓ/hrの割合で開始した。培地EおよびFの供給は、細胞重量が約10kgに達するまで継続した。存在する同化性窒素の量は、重合体を含め細胞約4.1kgまで微生物を繁殖させるに充分であつた。

## 実施例 20.

実施例19を反覆したが、培地Fの供給割合は25ℓ/hrで、醗酵は細胞重量約11kgになるまで継続した。この場合、同化性窒素の量は、重合体を含め細胞約4kgまで微生物が繁殖するに充分であつた。

実施例16~20の重合体は、それぞれβ-ヒドロキシ酪酸(HB)単位およびβ-ヒドロキシバレン酸(HV)単位を含む共重合体であり、重量平均分子量は300,000以上であつた。共重合体は、それぞれD(一)立体配置を有していた。

実施例16~20の各共重合体およびβ-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体100重量部を、クロロホルム約10重量部およびタルク1重量部でスラリー化し、家庭用肉ひき機で室温で粒状化した。次いで、組成物を乾燥してクロロホルムを除去し、190℃で押出してから、再び粒状化した。得られる粒状物を、185℃で試験用バーに射出成形し、型温度65℃および冷却時間2.0秒を用いた。引張特性を、ASTM D638-77aにより50/mm/分の速度で測定し、衝撃強度をASTM D 256-

78によりアイゾット衝撃試験で評価した。

\*トグラフィーの略である。

結果を、第4表に示した。表中、「GC」はガスクロマ\*

第 4 表

実施例	HV/HBモル比		0.5%伸びのモジュラス* (GPa)	引張強度 (MPa)	破断伸び (%)	アイゾット衝撃強度(J/m)	
	GCによる	NMRによる				1mmノッチ付	ノッチなし
16	18/82	20/80	1.47	25	10-31	66	463
17	4/96	8/94	2.98	33	5-7	23	140
18	8/92	7/93	2.10	31	14-19	106	408
19	1/99	4/98	2.70	35	8-14	56	191
20	4/960	4/96	2.48	35	8-15	23	140
ホモ重合度	0/100	0/100	3.25	40	6-13	65	115

#### 実施例 21.

下記成分を室温で乾式混合し、PVC配合物を作つた：

##### 重量部

(i) 塩化ビニルホモ重合体 (K62) 100

(ii) ジーN-ジチオグリコール酸エステルベースのチオオクタルスズ錯体の安定化剤 1.5

(iii) メチルメタクリレート/ブタジエン/スチレンP

VC衝撃改善剤 8

(iv) ワックス (外部油滑剤) 0.8

(v) グリセリンモノエステル (内部油滑剤) 1

(vi) HB重合体 (加工助剤) 2

HB重合体加工助剤は、次のものであつた：

(a) 実施例2で得たβ-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体

(b) 実施例7の共重合体 (共重合体A)

(c) 実施例16の共重合体 (共重合体B)

加工助剤は、約10wt%でスラリー化し、家庭用肉ひき機で室温で粒状化し、乾燥し、190℃で熔融押し出し、再度粒状化し、PVC乾燥混合物に配合する前に、粒子

寸法150μm以下に粉碎した。

乾燥混合物を、次のようにして試験した：

1. 混合物50gを、5kgの重錘で負荷した圧力ラムの下で18rpmで回転し、180℃に維持したBrabender Plastographの混合ヘッドに投入した。ゲル化が始まるに要した時間を、記録した。

2. 混合物を冷圧縮してキヤンドルにし、これを170℃に維持し、直径1mmおよび長さ2.0mmの円形オリフィスを有するダイを取付けた押し出しレオメーターに装入した。装入物が170℃に加熱された後、速度を増加させながら押し出した。押し出し物の外観を記録し、押し出し物をダイから引張つて熔融伸長性を評価した。

結果を、第5表に示した。

第 5 表

加工助剤	180℃でのゲル時間(分)	170℃での押し出し	
		外観	熔融伸長性
なし	12	低い押し出し速度でも荒いサメ肌	劣る
ホモ重合体	9.5	高速では波状はつきりと見える外観の未熔融重合体あり、劣る	劣る
共重合体A	1.0	優秀、極めてスムーズ	良好
共重合体B	1.5	スムーズ、しかし時々未熔融粒子あり	極めて良好

この実施例は、塩化ビニル重合体加工助剤として、共重合体は、β-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体より優れていることを示している。よりランダムな共重合体Aは、明らかに共重合体Bより秀れている。

#### 実施例 22.

培地Hを、次の組成で作つた：

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
(Na) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.005 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.002 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0.1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO	1.5 g
脱イオン水	全体で1ℓにする

培地のpHは、7であつた。

予じめメタクリル酸0.5gを溶解した培地H500mlをそれぞれ含む8個の1ℓ振とうフラスコに、Nocardia salmonicolor株ATCC19149の種培養物5mlを接種し、旋回振とう機上で32℃で培養した。

接種後24時間、48時間および72時間の間隔で、各フラスコにメタクリル酸0.5gづつを添加し、メタクリル酸0.25gの最終添加を96時間後に行つた。接

種後108時間で、各フラスコを検査した。どのフラスコでも、微生物の繁殖は殆んどなかった。フラスコ内容物を一緒にし、遠心分離して細胞のペレットにして、オーブンで乾燥してから計量した。ペレット重量は、2.81gであつた。接種物の細胞含有量も決定し、69. \*

\* 75 g/lであつた。したがつて、接種物としてフラスコに添加した細胞の全重量は、2.79gであつた。用いたメタクリル酸濃度では、この菌株は、メタクリル酸を同化しなかつた。

---

フロントページの続き

(72)発明者 スチーブン・ヒュー・コリンズ  
イギリス国クリーブランド・ストックトン  
ーオン・テイズ・ノートン・ザ・グリーン  
ン・ノートン・ホール (番地なし)

(72)発明者 レオナード・フレデリック・ライト  
イギリス国クリーブランド・ストックトン  
ーオン・テイズ・ノートン・ザ・グリーン  
ン・ノートン・ホール (番地なし)

(56)参考文献 西独特許2948023 (DE, A)  
村橋俊介他著「合成高分子V」(昭50、  
3、30、朝倉書店発行、P. 207~208、表  
4、13)